

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-214190
 (43)Date of publication of application : 31.07.2002

(51)Int.Cl. G01N 27/416
 C12M 1/40
 G01N 27/327
 // C12N 9/02

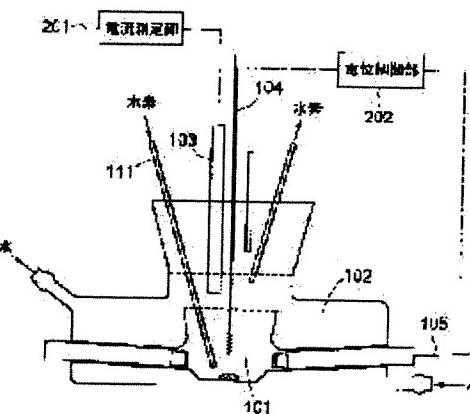
(21)Application number : 2001-005131 (71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY
 NEW COSMOS ELECTRIC CORP
 (22)Date of filing : 12.01.2001 (72)Inventor : MIYAKE ATSUSHI
 NAKAMURA CHIKASHI
 SEN TOUKIN
 ZORIN NIKOLAI
 FUKUI KIYOSHI
 NAKAMURA SHUNICHI

(54) CONSTANT-POTENTIAL ELECTROLYTIC HYDROGEN SENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a constant-potential electrolytic hydrogen sensor having high hydrogen selectivity.

SOLUTION: This constant-potential electrolytic hydrogen sensor comprises a working electrode 103 for chemically reacting a gas to be detected as a gas electrode for detecting the gas, a counter electrode 104 opposed to the working electrode 103, and a reference electrode 105 for controlling the potential of the working electrode 103, which electrodes are provided in opposition to the electrolyte housing part of an electrolytic tank 102 containing an electrolyte 101; a gas inlet part for guiding the gas to be detected to the working electrode 103; and an output circuit for providing a gas detection output electrically connected to each electrode. As the working electrode 103, a hydrogen oxidation activation layer containing a first hydrogen oxidation activating material having specific activity to hydrogen oxidation is provided, and the first hydrogen oxidation activating material contains hydrogenase as effective component. This sensor further contains a second hydrogen oxidation activating material having the function as electron transmitting mediator to the electrolyte 101.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.05.2007

[Date of sending the examiner's decision of

[rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-214190

(P2002-214190A)

(43)公開日 平成14年7月31日 (2002.7.31)

(51) Int.Cl.⁷
G 0 1 N 27/416
C 1 2 M 1/40
G 0 1 N 27/327
// C 1 2 N 9/02

識別記号

F I
C 1 2 M 1/40
C 1 2 N 9/02
G 0 1 N 27/46
27/30

テマコード^{*}(参考)
B 4 B 0 2 9
4 B 0 5 0
3 1 1 H
3 5 3 J
3 5 3 R

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-5131(P2001-5131)

(71)出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所
東京都千代田区霞が関 1-3-1

(22)出願日 平成13年1月12日 (2001.1.12)

(71)出願人 000190301

新コスマス電機株式会社
大阪府大阪市淀川区三津屋中2丁目5番4号

(72)発明者 三宅 淳

茨城県つくば市東1丁目1番4 経済産業省産業技術総合研究所産業技術融合領域研究所内

(74)代理人 100107308

弁理士 北村 修一郎

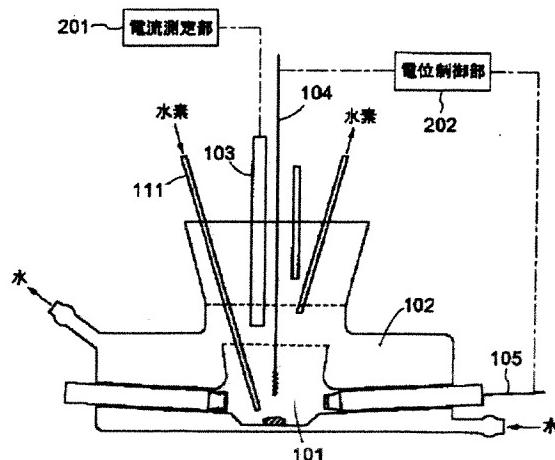
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 定電位電解式水素センサ

(57)【要約】

【課題】 高水素選択性を有する定電位電解式水素センサを提供する。

【解決手段】 ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極103、作用電極103に対する対極104、作用電極103の電位を制御する参照電極105を、電解液101を収容した電解槽102の電解液収容部に臨んで設け、作用電極103に被検知ガスを導くガス導入部111を設け、各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、作用電極103として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設け、第1水素酸化活性物質が有効成分としてヒドロゲナーゼを含有し、電解液101として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含有する定電位電解式水素センサ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、前記作用電極として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設け、前記第1水素酸化活性物質が有効成分としてヒドロゲナーゼを含有し、前記電解液として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含有する定電位電解式水素センサ。

【請求項2】 前記水素酸化活性層が、ポリーリジン(PLL)を改質材として用いたヒドロゲナーゼの単分子膜あるいはLB膜あるいはキャスト膜である請求項1に記載の定電位電解式水素センサ。

【請求項3】 ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、前記電解液として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質としてヒドロゲナーゼが添加された溶液を用い、

前記作用電極として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設けてある電極を用いる定電位電解式水素センサ。

【請求項4】 ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、

前記作用電極として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質であるヒドロゲナーゼと、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質とを含んだ水素酸化活性層を設けてある定電位電解式水素センサ。

【請求項5】 前記第2水素酸化活性物質が、ビオロゲン化合物あるいはシトクロムc₃を含有している請求項1～4のいずれか一項に記載の定電位電解式水素センサ。

【請求項6】 前記ビオロゲン化合物が、MV、PB

V、POVである請求項1～5のいずれか一項に記載の定電位電解式水素センサ。

【請求項7】 ヒドロゲナーゼを含む水素酸化活性層がPEGDGEを含有する請求項1又は2又は4又は5のいずれか一項に記載の定電位電解式水素センサ。

【請求項8】 前記水素酸化活性層が前記第1水素酸化活性物質および前記第2水素酸化活性物質を担持した活性炭粉末を塗着して形成してある請求項1～7のいずれか一項に記載の定電位電解式水素センサ。

10 【請求項9】 前記ヒドロゲナーゼが、チオカプサロセオペルシナ(Thiocapsa roseopersicina)BBS株由来である請求項1～8のいずれか一項に記載の定電位電解式水素センサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、水素の検知には水素ガスセンサとして、水素と他のガスとの気体熱伝導率の違いを利用する気体熱伝導式、水素の触媒燃焼による素子温度の上昇を利用する接触燃焼式、水素による半導体粒子表面の吸着酸素の消費に伴う半導体素子の自由電子の増加(抵抗値の減少)を利用する半導体式などが用いられている。また、水素の電気化学的酸化に伴う電流値を測定する電気化学式(定電位電解式)が用いられており、これは電解液を用いる湿式と固体電解質を用いる乾式が知られている。これら水素ガスセンサはそれぞれ得意とする濃度範囲や設置条件があり、用途に応じて使い分けられている。また、これら水素ガスセンサは、様々な工夫により他の可燃性ガスに対する水素の感度比を大きく向上させることにより、感度良く水素を認識することができるため、水素ガス漏洩を検知する手段として広く使用されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述した従来の水素ガスセンサは、他の可燃性ガスに対する水素の感度比を大きく向上させることにより水素を感度良く検知できるようとしたものであり、原理的に水素だけに感度を有するというようなものではない。このため、水素に対する高感度化には限界があり、さらに、水素以外の可燃性ガスを検知する可能性を否定できないため、水素ガスセンサからの警報には誤報が含まれている可能性があるといった問題を常に考慮した上で使用する必要があった。

50 【0004】従って、本発明の目的は、高水素選択性を

有する定電位電解式水素センサを提供することにある。

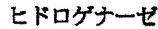
【0005】

【課題を解決するための手段】近年、水素とプロトンとの酸化還元反応を特異的に触媒する蛋白質として知られるヒドロゲナーゼについての研究が進み、熱や酸素に対して十分な安定性を有するヒドロゲナーゼが発見された。さらに、ヒドロゲナーゼ生成菌の培養技術、ヒドロゲナーゼの分離精製技術が確立されている。また、ヒドロゲナーゼの電極への固定化技術等が研究されている。このように電極にヒドロゲナーゼを固定することにより、ヒドロゲナーゼを触媒として電気化学的もしくは光化学的に電流を検出したり、水素を発生させる試みがなされている。また、ヒドロゲナーゼにおいては、水素の酸化還元に作用する活性部位は局在化していると考えられており、電極とヒドロゲナーゼとの直接的な電子の授受は困難であると考えられているため、電極とヒドロゲナーゼとの間の電子の授受を仲介するメディエータが不可欠である。つまり、電子キャリアとしてメディエータを化学結合したポリマーを電極表面に固定化し、緩衝液中において、水素溶存下でのヒドロゲナーゼの水素酸化による電流を検出したり、光励起により電子を放出する亜鉛錯体を用いることで、光化学的に水素を発生させるのである。

【0006】この反応は、化1の正反応に示したように、ヒドロゲナーゼを触媒として、緩衝液中のプロトンを還元することにより水素を発生させたものである。

【0007】

【化1】



【0008】本発明者らは、ヒドロゲナーゼは水素とプロトンの酸化還元反応を特異的に触媒する蛋白質であるから、化1で示した正反応の逆反応においても、緩衝液中の電極上で起こることが可能ではないかと考えた。さらに、上記目的を達成すべく、水素の酸化によるプロトンと電子の生成を電極に固定されたヒドロゲナーゼを触媒として行わせ、生じた電子を出力回路により検出することによって、水素に対して高選択性を有する水素ガスセンサとして利用できるのではないかと考え本発明に想到した。

【0009】ここで、前述のように、ヒドロゲナーゼを電極に固定し、メディエータを使用してヒドロゲナーゼと電極間の電子の授受を行い水素を発生させる反応は周知の技術であったが、水素を高感度に選択するための水素ガスセンサとして機能する電気化学的なセンサとしてヒドロゲナーゼを使用する技術はこれまで提案されていなかった。つまり、本発明は、本発明者らの前述の知見に基づき、多くの実験を重ねた上で実験的に確認され、完成に至ったものである。

【0010】【構成1】この目的を達成するための本發

明の特徴構成は、請求項1に記載のように、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、前記作用電極として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設け、前記第1水素酸化活性物質が有効成分としてヒドロゲナーゼを含有し、前記電解液として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含有することにある。

【0011】また、この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項2に記載のように、請求項1に記載の発明において、前記水素酸化活性層が、ポリーリジン（PLL）を改質材として用いたヒドロゲナーゼの単分子膜あるいはLB膜あるいはキャスト膜であることにある。

【0012】【作用効果1】つまり、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参照電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設けてあるから、前記ガス導入部より被検知ガスを前記作用電極に導くことが出来、導かれた前記被検知ガスが前記作用電極上において酸化反応することにより酸化電流が流れ、さらに、前記対極上では酸素の還元反応が起り、前記作用電極上で生じた酸化電流と等量の還元電流が流れ。この反応に伴って流れる電流量は、前記作用電極上で反応した被検知ガス濃度に比例しており、前記各電極に電気接続してあるガス検知出力を得る出力回路によりこの電流量を測定することによって、前記被検知ガスの濃度が測定できるのである。またガス種によって酸化還元電位が異なることを利用しているため、前記回路の設定電位によってはガスの選択的な検知が可能になる。また、ガス電極に用いる触媒を変えることで、目的とするガスに対して高い選択性を持たすことができる。

【0013】また、前記作用電極に水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設け、前記第1水素酸化活性物質が有効成分としてヒドロゲナーゼを含有することによって、前記作用電極に用いる触媒を水素に特異的な触媒とすることが出来る。つまり、前記ヒドロゲナーゼは、水素を特異的に酸化還元する蛋白質であるため、前記ヒドロゲナーゼを前記水素酸化活性層に含有させることによって、前記作用電極は水素に高い選択性を有することになるのである。

【0014】ここで、前記ヒドロゲナーゼは親水性の蛋白質であり、水素の酸化還元に作用する活性部位は局在

化していると考えられており、電極とヒドロゲナーゼとの直接的な電子の授受は困難であると考えられているため、電極とヒドロゲナーゼとの間の電子の授受を仲介するメディエータが不可欠である。このため、前記電解液中に電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含有することにより、図3に示したように、前記作用電極付近で酸化分解された水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極に前記電子を伝達することが円滑に行われるものである。

【0015】このように、水素に高い選択性を有する前記作用電極に前記メディエータを介して円滑に電子を伝達することが出来るのであるから、水素に高い選択性を有する定電位電解式水素センサを提供することが出来るのである。また、水素の原料となるメタノール、メタンや一酸化炭素などには感度を示さず、水素に高い感度を有する水素ガスセンサ提供できれば、将来の水素エネルギー・システムのメンテナンスや安全対策に非常に役立つものと期待される。

【0016】ここで、高効率の電子伝達を可能にするための薄膜として、単分子膜、LB (Langmuir-Blodgett) 法により作成されたLB膜、キャスト法により作成されたキャスト膜がある。これらの膜の作成に用いられる分子は分子内に疎水性と親水性が分離して存在することが好ましいことが知られている。また、ヒドロゲナーゼの多くは親水性であるため、例えば、後述の実施例1に記載のPLL等の改質材を用いることによりヒドロゲナーゼの活性を変化させること無く疎水性を付与することが出来る。つまり、PLLを改質材として用いたヒドロゲナーゼの単分子膜やLB膜を水素酸化活性層として用いれば、親水基と疎水基とを配向配列させることができ、高効率の電子伝達が実現するのである。

【0017】〔構成2〕この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項3に記載のように、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参考電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、前記電解液として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質としてヒドロゲナーゼが添加された溶液を用い、前記作用電極として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設けた電極を用いることがある。

【0018】〔作用効果2〕つまり、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御す

る参考電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してあるから、請求項1に記載の定電位電解式水素センサの基本的な構成を採用することが出来るのである。

【0019】また、前記電解液として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質としてヒドロゲナーゼが添加された溶液を用いることにより、前記電解液中に含まれる前記ヒドロゲナーゼによって水素を特異的に酸化分解することができる。さらに、前記作用電極として、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質を含んだ水素酸化活性層を設けてある電極を用いることにより、図4に示したように前記作用電極付近で酸化分解された前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極に前記電子を伝達することが円滑に行われるのである。また、酸化反応の触媒としてヒドロゲナーゼを用いているから、水素に高い選択性を有する定電位電解式水素センサを提供することが出来るのである。

【0020】〔構成3〕この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項4に記載のように、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参考電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してある定電位電解式水素センサであって、前記作用電極として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質であるヒドロゲナーゼと、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質とを含んだ水素酸化活性層を設けたことがある。

【0021】〔作用効果3〕つまり、ガスを検知するガス電極として被検知ガスを化学反応させる作用電極、前記作用電極に対する対極、前記作用電極の電位を制御する参考電極を、電解液を収容した電解槽の電解液収容部に臨んで設け、前記作用電極に被検知ガスを導くガス導入部を設け、前記各電極にガス検知出力を得る出力回路を電気接続してあるから、請求項1に記載の定電位電解式水素センサの基本的な構成を採用することが出来るのである。

【0022】また、前記作用電極として、水素酸化に特異的な活性を有する第1水素酸化活性物質であるヒドロゲナーゼと、電子伝達のメディエータとしての機能を有する第2水素酸化活性物質とを含んだ水素酸化活性層を設けてあるから、前記ヒドロゲナーゼによって水素を特異的に酸化分解することができ、さらに、図5に示したように、前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極に前記電子を伝達す

ることが円滑に行われるのである。

【0023】また、酸化反応の触媒としてヒドロゲナーゼを用いているから、水素に高い選択性を有する定電位電解式水素センサを提供することが出来るのである。

【0024】〔構成4〕また、この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項5に記載のように、請求項1～4の発明において、前記第2水素酸化活性物質が、ビオロゲン化合物あるいはシトクロムc₃を含有していることにある。

【0025】また、請求項6に記載のように、前記ビオロゲン化合物はメチルビオロゲン(MV)、ポリブチルビオロゲン(PBV)、ポリオクチルビオロゲン(POV)であるのが好ましい。

【0026】また、この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項7に記載のように、請求項項1又は2又は4又は5のいずれか一項の発明において、ヒドロゲナーゼを含む水素酸化活性層がPEGDGEを含有することにある。

【0027】〔作用効果4〕つまり、前記第2水素酸化活性物質に含まれるメディエータとしてビオロゲン化合物あるいはシトクロムc₃を使用するのが好ましい。

【0028】前記ビオロゲン化合物としては、MV、PBV、POV等のビオロゲンポリマーが含まれる。図7に前記MVをメディエータとして用いた場合の前記作用電極表面における電子伝達の様子を示す。つまり、水素がヒドロゲナーゼにより酸化され、この時生じた電子がMVに伝達され、前記MVは還元型MVとなる。この還元型MVは速やかに酸化されるのであるが、この際、前記作用電極に電子を伝達するのである。また、前記ビオロゲン化合物は、合成し易く、電極表面での固定も容易であることから、汎用性の高いメディエータとして期待される。

【0029】また、前記ビオロゲン化合物を用いた場合、前記ビオロゲン化合物は前記ヒドロゲナーゼと複合体を形成し安定な分子膜を形成しているものと考えられるため、前記ビオロゲン化合物は電子伝達のメディエータとして機能するだけでなく、安定した水素酸化活性層を有する作用電極を提供することが出来る。

【0030】前記シトクロムc₃は、硫酸還元菌中ではヒドロゲナーゼから電子を受け取り細胞内に運び込む、ヒドロゲナーゼの電子伝達体としての機能を有するものであり、乾燥状態でも電子伝達活性が保持されているものである。特に固体膜において高い電気導電性を有するものであるから、前記作用電極の前記水素酸化活性層に前記第2水素酸化活性物質として含有させた場合には、酸化反応の結果生じた電子の伝達を容易に行うことが出来るようになる。一方、前記電解液中に第2水素酸化活性物質として含有させた場合においても電子伝達活性が保持されているため、酸化反応の結果生じた電子の伝達を容易に行うことが出来るようになる。

【0031】また、ヒドロゲナーゼを含む前記水素酸化活性層に、ヒドロゲナーゼ膜安定化材として、Poly(Ethylene glycol) diglycidylether(PEGDGE)を加えてもよい。前記PEGDGEを前記水素酸化活性層に添加した場合、前記水素酸化活性層は安定性を増すことが期待される。

【0032】〔構成5〕また、この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項8に記載のように、請求項1～7の発明において、前記水素酸化活性層が前記第1水素酸化活性物質および前記第2水素酸化活性物質を担持した活性炭粉末を塗着して形成してあることにある。

【0033】〔作用効果5〕つまり、前記水素酸化活性層が前記第1水素酸化活性物質であるヒドロゲナーゼや前記第2水素酸化活性物質であるメディエータを担持した活性炭粉末を塗着して形成すれば、前述のように単分子膜やLB膜を作製して前記作用電極上に固定する必要が無いため、簡便に水素に高い選択性を有する作用電極を作製することができ、その結果、簡便に水素に高い選択性を有する定電位電解式水素センサを提供することが出来る。そのため、製造コストの安価な定電位電解式水素センサを提供することが出来るのである。

【0034】また、前記活性炭粉末等のカーボンは、作用電極材料としても用いられており、電導性が高いため、前記作用電極への電子の伝達が容易に行われる。

【0035】〔構成6〕また、この目的を達成するための本発明の特徴構成は、請求項9に記載のように、請求項1～8の発明において、前記ヒドロゲナーゼが、チオカプサロセオペルシナ(Thiocapsaroseopersicina)BBS株由来であることある。

【0036】〔作用効果6〕つまり、チオカプサロセオペルシナ(Thiocapsaroseopersicina、以下T. roseopersicinaとする)のBBS株より精製したヒドロゲナーゼは、熱や酸素に対して十分な安定性を有し、70℃付近で最適な酵素活性を示す。さらに、前記LB膜中においても酵素活性は30～70℃において良好に保持されている(図9参照)。このため、水素検出のために前記定電位電解式水素センサにおける前記電解液や前記LB膜の温度が70℃付近まで上昇したとしても、前記T. roseopersicinaのBBS株由来のヒドロゲナーゼを使用することによって、酵素活性が失活することなく安定性の高い定電位電解式水素センサを提供することが出来るのである。

【0037】
【発明の実施の形態】以下に本発明の実施の形態を図面に基づいて説明するが、本発明は、これらによって限定されるものではない。

50 〔実施例1〕本発明の定電位電解式水素センサは、図1

に示すような水素発生測定用装置を水素を検知すべく改変して用いることで実施可能である。つまり、電解液101を収容する電解槽102を形成する容器を設け、その電解槽102に収容した電解液101と接触自在になるように、被検知ガスを化学反応させる作用電極103、作用電極に対する対極104、前記作用電極の電位を制御する参考電極105を設けて構成してある。また、前記作用電極103は、ガス導入部111より導入された被検知ガスを前記作用電極103上で反応させる反応部に形成してある。前記作用電極103は、材料として酸化インジウム(ITO)、黒鉛、金、グラスカーボン等を用いることができる。また、前記対極104は白金ワイヤーや金ワイヤーを用いることができ、前記参考電極105は銀、塩化銀電極で形成してある。前記電解液101として、酸性水溶液等を用いることが出来る。また、前記電解液101の温度を一定に保つために循環ポンプにより、水を循環させてもよい。

【0038】前記作用電極103上で生じた電子に基づく電流を検知自在な電流測定部201と前記作用電極103の電位制御自在な電位制御部202とを備えたガス検知回路に接続してガス検知装置として用いられる。

【0039】前記作用電極103表面上に、水素酸化に特異的な酵素活性を有するヒドロゲナーゼを含有した水素酸化活性層を設けることにより前記作用電極103は水素に高い選択性を有することになるのである。この時、前記作用電極103とヒドロゲナーゼとの直接的な電子の授受は困難であると考えられているため、前記作用電極103とヒドロゲナーゼとの間の電子の授受を仲介するメディエータを前記電解液101中に含有させることにより、図3に示したように前記作用電極103付近で酸化分解された前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極103に前記電子を伝達することが円滑に行われるのである。この時、前記電解液101中に含有させる前記メディエータとしては、ビオロゲン化合物であるメチルビオロゲン(MV)を使用するのが好ましい。

【0040】前記ヒドロゲナーゼは、紅色硫黄細菌であるT. roseopersicinaのBBS株(Biochemistry(Moscow) 60, 379-384(1995)参照)をPfennigの方法を改良して嫌気条件下で培養し、Zorinらの方法に従って精製したものを用いた(図8参照)。

【0041】また、前記作用電極103表面の前記水素酸化活性層が、ヒドロゲナーゼの単分子膜あるいはLB膜として配向配列することによって、高効率の電子伝達を可能にすることが出来る。高効率の電子伝達を可能にするための薄膜作成技術として、LB(Langmuir-Blodgett)法がある。LB法に用いられる分子は、分子内に疎水性、親水性が分極して存在することが必要である。タンパク質分子表面には疎水、親水部

位がモザイク状に存在し、脂質分子の様な分極が少ない。また、分子全体として親水性のものが多く、気液界面で展開できず、水に溶解してしまうものが多い。ヒドロゲナーゼの多くは親水性であり、前記T. roseopersicinaのBBS株より精製したヒドロゲナーゼにおいても同様である。それ故、水溶性タンパク質のLB膜を作製する上で重要なことは、分子を変性させず、水溶性タンパク質に疎水性を付与することである。この目的のために、PLLを改質材として用いることにより、ヒドロゲナーゼのLB膜を作製することができる。ここで、LB膜作製におけるPLLの役割は、PLLとヒドロゲナーゼが静電的相互作用により複合体を形成し、ヒドロゲナーゼの表面電荷が打ち消され、タンパク質の親水性が減少する。さらに、PLLがヒドロゲナーゼ間を架橋し、界面に展開されたタンパク質が下層水に溶け込みにくくなり、気液界面において単分子膜やLB膜が形成されるのである。

【0042】前記下層水には10mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)を用いた。前記Tris-HCl緩衝液に、1.1mg/mlのヒドロゲナーゼ溶液20μlを滴下し、周知のグラスロッド法により展開することにより、気液界面上に分子膜を形成させた。PLLは前記下層水中にリジンモノマー濃度で0.5mMを添加する。また、前記PLLが20残基のペプチドの場合は、2.5μMを添加する。気液界面上に展開した前記分子膜を、前記作用電極103であるITO基板(4x30x1mm)上に30mN/mの条件で積層化し、この層を水素酸化活性層とすることで前記作用電極103表面上にヒドロゲナーゼの単分子膜あるいはLB膜を作成した。

【0043】つまり、PLLを用いることによりヒドロゲナーゼの活性を変化させること無く疎水性を付与することが出来る。つまり、ヒドロゲナーゼを単分子膜やLB膜として水素酸化活性層に配列させることができるのであるから、高効率の電子伝達が実現するのである。

【0044】このようにして作製したLB膜中のヒドロゲナーゼの熱安定性を、加熱後の水素発生による活性で評価した。水素発生は前述の周知の水素発生測定用装置を用いて周知の方法により行った。前記LB膜の加熱(30-100°C)は、電熱線のオーブンを用いて10分間行った。測定に用いた前記LB膜は、石英基板上に一層に累積した膜(0.39mg/cm²)を用いた。比較対照として溶液状態のヒドロゲナーゼを用いた。前記LB膜中と等量のヒドロゲナーゼを含む緩衝液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0)を湯浴中で加熱(30-100°C)した後、活性測定を行った。前記LB膜中のヒドロゲナーゼの熱安定性について評価を行った結果を図9に示す。前記LB膜中のヒドロゲナーゼの水素発生の活性は、30-70°Cにおいて保持されていた。完全な失活は前記緩衝液中のヒドロゲナーゼお

よび前記LB膜中のヒドロゲナーゼとともに100°Cであった。尚、前記T. roseopersicinaのBBS株より精製されたヒドロゲナーゼの活性最適温度は7.0°Cであるため、前記ヒドロゲナーゼは、定電位電解式水素センサでの使用において十分な安定性を有することが判明した。

【0045】また、高効率の電子伝達を可能にするための薄膜として、キャスト法により作製されたキャスト膜がある。このキャスト膜は、ヒドロゲナーゼ(13mg/mL)2μL、ポリビオロゲン(10mg/mL)2μL、Poly(Ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE)(10mg/mL)2μLから成る6μLの蛋白質溶液を、約7mm²の面積を有するカーボン電極の表面に塗布することにより形成したキャスト面を4°Cにて24時間放置した後、前記キャスト面を透析膜にて被覆し、O-リングで固定することにより作製されるものである。

【0046】前記水素発生用測定装置に、逆に水素を通気し、各電極からの出力がどのように得られるかを求めたところ、図10のようになつた。通気は100%水素及び100%アルゴン(Argon)によりコントロールした。図10によると、前記水素発生用測定装置に水素を通気すると次第に電極から電流出力が得られていることが判る。また、この電流値は、水素の通気に伴い上昇していることから、電解液中の水素濃度に比例することが読み取れる。また、アルゴンの通気により電解液中の水素濃度が低下すると電流出力が低下すると共に、再度水素を通気すると再現性よく電流出力が上昇することが判る。これにより、水素を含有する検知対象ガスを通気した時の定的な電流出力強度あるいは、電流出力強度の上昇速度(電解液中の水素濃度の上昇速度)を知ることにより、前記検知対象ガス中の水素濃度を知ることが出来ることが判る。

【0047】【実施例2】また、実施例1で用いた水素発生測定用装置の構成を採用し、前記電解液101としてヒドロゲナーゼを添加した溶液を用い、さらに、前記作用電極103として、ヒドロゲナーゼとの間の電子の授受を仲介するメディエータに被覆された電極を用いることも可能である。これにより、図4に示したように前記作用電極103付近で酸化分解された前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極103に前記電子を伝達することが円滑に行われるのである。

【0048】前記電解液101として、20mMリン酸カリウム(K₃PO₄)と20mM塩化カリウム(KCl)(pH7.0)に7μg/mLの終濃度でヒドロゲナーゼを添加した。また、循環ポンプにより、水を循環させて前記電解液101を30°Cに維持して使用した。

【0049】前記作用電極103として、金電極を用い、前記メディエータとして前記ビオロゲン化合物に含

まれるメチルビオロゲン化合物にチオール基を付し、これを自己集合单分子膜(SAM膜)として図6に示したように前記作用電極上に固定した。この時、自己集合单分子膜上のビオロゲンの活性部位は、前記電解液中で揺らぐことが出来るため、前記電解液中に含まれるヒドロゲナーゼの活性部位と容易に結合し、酸化反応の結果生じた電子の伝達を容易に行うことが出来るようになる。尚、前記メチルビオロゲン化合物として、N-methyl-N'-(mercaptooctyl)-4,4'-bipyridiniumを用いると、チオール基が容易に金電極と反応し、固定化される。

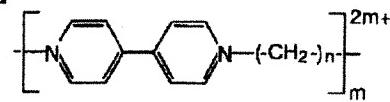
【0050】前記ビオロゲン化合物以外に、硫酸還元菌中においてヒドロゲナーゼから電子を受け取り細胞内に運び込み、ヒドロゲナーゼの電子伝達体としての機能を有し、乾燥状態でも電子伝達活性が保持されているシクロムクロムc₃を使用しても同様の効果が得られることが判る。

【0051】【実施例3】また、実施例1で用いた水素発生測定用装置の構成を採用し、前記作用電極103の水素酸化活性層として、ヒドロゲナーゼとメディエータとの混合膜とすることも可能である。この時、図5に示したように、前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極103に前記電子を伝達することが円滑に行われるのである。

【0052】前記作用電極103の材料として酸化スズを用い、前記メディエータとしては、ビオロゲン化合物に含まれるビオロゲンポリマーであるポリブチルビオロゲン(PBV)、ポリオクチルビオロゲン(POV)等を使用するのが好ましい。ここで、前記ビオロゲンポリマーは化2の一般式で表わすことができる。

【0053】

【化2】



【0054】この一般式において、n=4がPBV、n=8がPOVである。

【0055】前記ビオロゲンポリマーは水溶性であり、混合膜である混合LB膜作製時に下層水である10mMTrisバッファー(pH7.4)に溶解させた。KS Vミニトラフにて前記混合LB膜を作製した。0.29mg/mLのヒドロゲナーゼ100μLを水面上に展開し、圧縮を行うことで、気液界面上にヒドロゲナーゼ分子膜の作製を行つた。前記ヒドロゲナーゼ分子膜は30mN/mの表面圧に維持し、前記酸化スズ電極基板を1回垂直方向に浸漬する方法で累積し、ビオロゲンポリマーとヒドロゲナーゼとの混合LB膜を作製した。

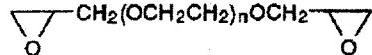
【0056】前記ビオロゲンポリマーは前記ヒドロゲナーゼと複合体を形成し安定な分子膜を形成しているもの

と考えられる。そのため、前記ビオロゲンポリマーは電子伝達のメディエータとして機能するだけでなく、安定した水素酸化活性層を有する作用電極を提供することが出来る。

【0057】さらに、ヒドロゲナーゼ膜安定化材として前記混合膜の構成に、前記PEGDGEを加えてもよい。前記PEGDGEは、化3に示した構造式で表わすことができる。

【0058】

【化3】



【0059】前記PEGDGEを前記水素酸化活性層に添加した場合、前記水素酸化活性層は安定性を増すことが期待される。例えば、グラスカーボン電極の表面上に設けられたヒドロゲナーゼとPBVを含有する水素酸化活性層に前記PEGDGEを添加することにより形成したキャスト膜の安定性を増大させることができる。

【0060】また、前記水素発生用測定装置において、通気する水素濃度を種々変化させた場合の出力を測定した所、図11(a)に示す結果が得られた。この時、

(1) ヒドロゲナーゼとPBVの混合膜に安定化材としてPEGDGEを添加した水素酸化活性層を設けた電極、(2) グラスカーボンのみの電極、(3) ヒドロゲナーゼの単分子膜にPEGDGEを添加した水素酸化活性層を設けた電極とを用いた。つまり、(1)の電極を用いて経時に水素濃度を変化させた場合においては、通気した被検知ガスが100%水素である場合の出力は約1.0 μA、50%水素である場合の出力は約0.6 μA、30%水素である場合の出力は約0.3 μA、10%水素である場合の出力は約0.05 μAであった。また、(2)の電極を用いて経時に水素濃度を変化させた場合においては、いずれの水素濃度においても出力は得られなかった。さらに、(3)の電極を用いて経時に水素濃度を変化させた場合においては、水素濃度50~100%付近で出力は得られたものの、水素濃度50%以下では出力は得られなかった。尚、(3)の電極を持ちいて得られた出力は微弱だったので、出力値を5倍して表示してある。

【0061】これらの結果より、ヒドロゲナーゼとメディエータであるPBVとが存在することにより、良好に出力が得られることが判った。さらに、この出力は、水素濃度に対応したものであることが判った。

【0062】また、(1)の電極を用いて得られた水素濃度と得られた出力値との関係を明確にするためにグラフにプロットした所、図11(b)に示したように、ほぼ直線状のグラフが得られた。つまり、通気する水素濃度を種々変化させた場合に得られる出力は、水素濃度に正比例することが判明した。これにより、得られた電流出力より、容易に水素濃度を求められることが可能とな

るのである。

【0063】【実施例4】前述の実施例1~3において、前記水素酸化活性層が、前記ヒドロゲナーゼや前記メディエータを担持した活性炭粉末を塗着して形成された構成とすることも可能である。つまり、実施例1の構成においては、前記ヒドロゲナーゼを前記活性炭粉末に担持させて前記作用電極103に塗着させる。実施例2の構成においては、前記メディエータを前記活性炭粉末に担持させて前記作用電極103に塗着させる。実施例10 3の構成においては、前記ヒドロゲナーゼと前記メディエータを前記活性炭粉末に担持させて前記作用電極103に塗着させるのである。このように構成することにより、前述のように単分子膜やLB膜を作製して前記作用電極上に固定する必要が無いため、簡便に水素に高い選択性を有する作用電極を作製することができ、その結果、簡便に水素に高い選択性を有する定電位電解式水素センサを提供することができる。

【0064】【別実施例】本発明の定電位電解式水素センサは、図2に示したような周知の定電位電解式ガスセンサにおいても実施可能である。つまり、電解液101を収容する電解槽102を形成するケーシングを設け、前記電解槽102に収容した前記電解液101と接触自在になるように被検知ガスを化学反応させる作用電極103、前記作用電極に対する対極104、前記作用電極の電位を制御する参照電極105を設けて構成してある。前記作用電極103、前記対極104及び前記参照電極105は、ガス透過性の多孔質テフロン(登録商標)膜107の表面に、白金や金、パラジウム等の貴金属触媒を塗布焼結して形成したものである。ガス導入部より導入された被検知ガスは、前記多孔質テフロン膜107を通過した後、触媒(固相)、電解液(液相)、ガス(気相)の三相界面において電気化学反応を行うのである。

【0065】ここで、前記作用電極103の表面上に水素酸化に特異的な酵素活性を有するヒドロゲナーゼを含有した水素酸化活性層を設けることにより前記作用電極103は水素に高い選択性を有することになるのである。この時、電子の授受を仲介するメディエータを前記電解液101中に含有されることにより、前記作用電極103付近で酸化分解された前記水素の酸化反応の結果生じた電子を前記メディエータが仲介し、前記作用電極103に前記電子を伝達することが円滑に行われる。この時、前記電解液101中に含有させる前記メディエータとしては、ビオロゲン化合物であるメチルビオロゲン(MV)を使用するのが好ましい。

【0066】また、この定電位電解式ガスセンサの構成において、前記作用電極103をヒドロゲナーゼとの間の電子の授受を仲介するメディエータを含んだ水素酸化活性層を設けた電極とし、前記電解液101としてヒドロゲナーゼを添加した溶液を用いることも可能である。

さらに、この定電位電解式ガスセンサの構成において、前記作用電極103の水素酸化活性層をヒドロゲナーゼとメディエータとの混合膜とすることも可能である。

【0067】前記メディエータは、前記メチルビオロゲン(MV)の他に、ビオロゲン化合物に含まれるビオロゲンポリマーであるポリブチルビオロゲン(PBV)、ポリオクチルビオロゲン(POV)等が使用可能であり、前記ビオロゲン化合物に含まれるメチルビオロゲン化合物にチオール基を付し、これを自己集合单分子膜(SAM膜)として前記作用電極103表面上に固定することも可能である。さらに、前記作用電極103の水素酸化活性層を前記混合膜とした場合、膜の安定化材としてPoly(Ethylene glycol) diglycidylether(PEGDGE)を加えてもよい。

【0068】また、前記メディエータは、前記ビオロゲン化合物以外にも、硫酸還元菌中においてヒドロゲナーゼから電子を受け取り細胞内に運び込み、ヒドロゲナーゼの電子伝達体としての機能を有し、乾燥状態でも電子伝達活性が保持されているシトクロムc₃を使用することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の定電位電解式水素センサの実施例の概略図

【図2】本発明の定電位電解式水素センサの別実施例の概略図

【図3】作用電極にヒドロゲナーゼを含有した水素酸化活性層を設け、電解液にメディエータを添加した溶液を用いた定電位電解式水素センサにおける、ヒドロゲナー*

*ゼとメディエータと作用電極との間の電子伝達の概略図

【図4】作用電極にメディエータを含有した水素酸化活性層を設け、電解液にヒドロゲナーゼを添加した溶液を用いた定電位電解式水素センサにおける、ヒドロゲナーゼとメディエータと作用電極との間の電子伝達の概略図

【図5】作用電極にヒドロゲナーゼとメディエータを含有した水素酸化活性層を設けた定電位電解式水素センサにおける、ヒドロゲナーゼとメディエータと作用電極との間の電子伝達の概略図

10 【図6】作用電極に自己集合单分子膜(SAM膜)を固定した図

【図7】メチルビオロゲン(MV)をメディエータとして用いた場合の作用電極表面における電子伝達の概略図

【図8】ヒドロゲナーゼの精製法の概略図

【図9】LB膜中のヒドロゲナーゼの熱安定性について評価を行ったグラフ

【図10】水素通気による電流応答のグラフ

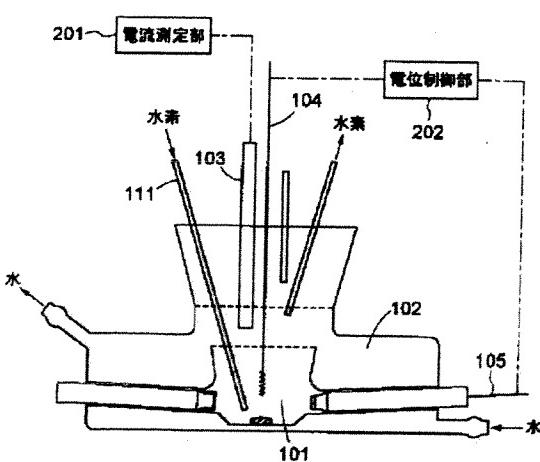
【図11】通気する水素濃度を種々変化させた場合の電流応答のグラフ

20 (a) 経時に水素濃度を変化させた場合の出力
(b) 水素濃度と得られた出力値との関係

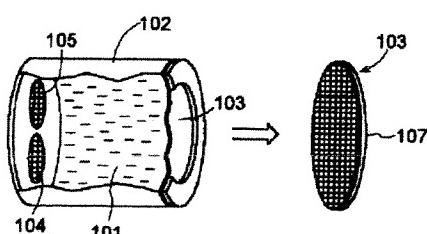
【符号の説明】

- | | |
|-----|----------|
| 101 | 電解液 |
| 102 | 電解槽 |
| 103 | 作用電極 |
| 104 | 対極 |
| 105 | 参照電極 |
| 107 | 多孔質テフロン膜 |
| 111 | ガス導入部 |

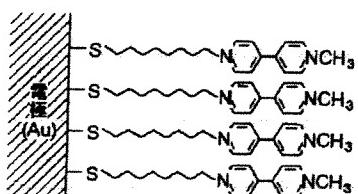
【図1】



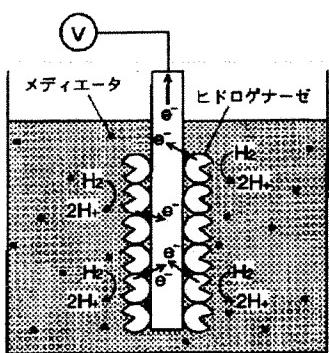
【図2】



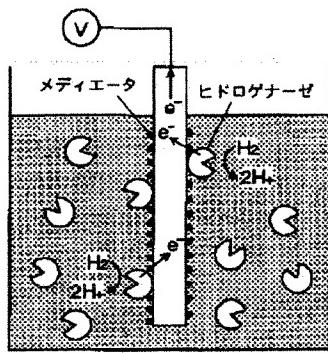
【図6】



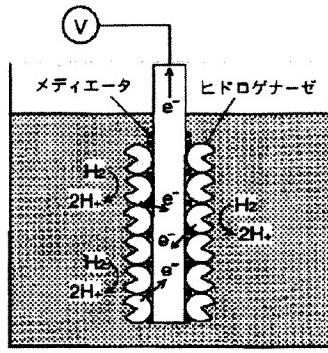
【図3】



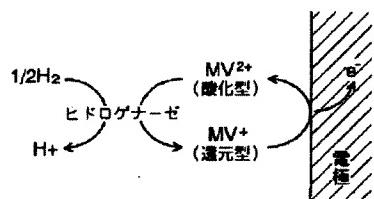
【図4】



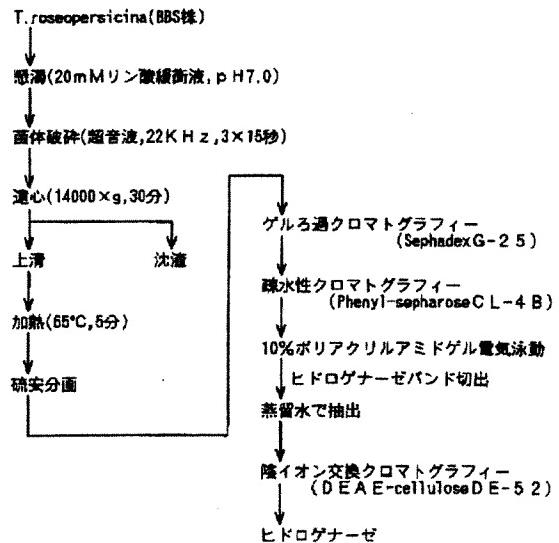
【図5】



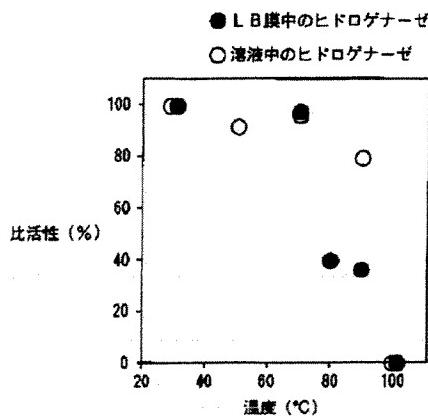
【図7】



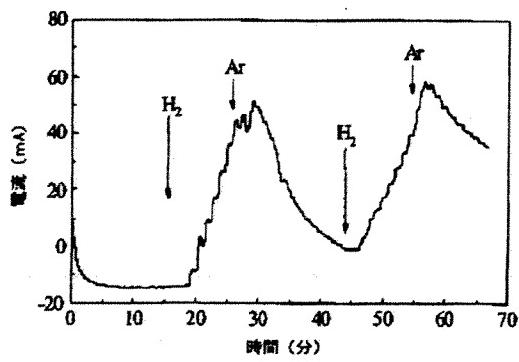
【図8】



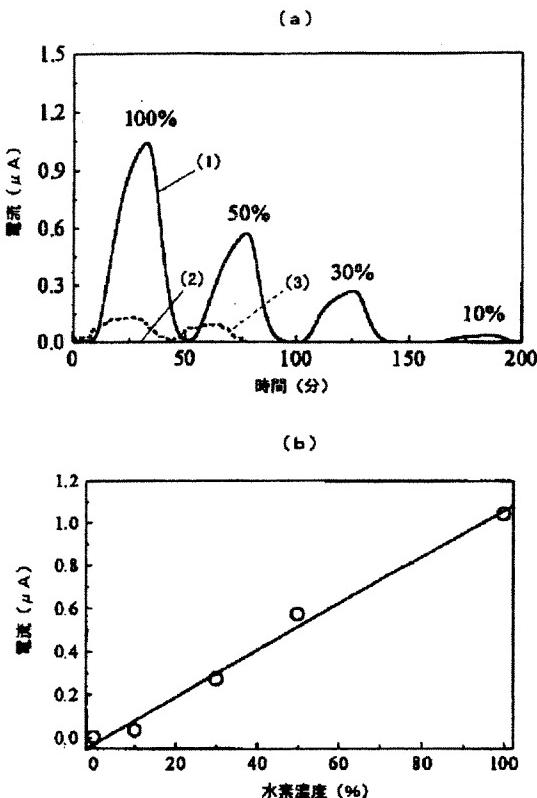
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I
G 01 N 27/46

マーク (参考)

U

311A

(72) 発明者 中村 史

茨城県つくば市東1丁目1番4 経済産業省産業技術総合研究所産業技術融合領域研究所内

(72) 発明者 銭 東金

茨城県つくば市東1丁目1番4 経済産業省産業技術総合研究所産業技術融合領域研究所内

(72) 発明者 ニコライ ゾーリン

茨城県つくば市東1丁目1番4 経済産業省産業技術総合研究所産業技術融合領域研究所内

(72) 発明者 福井 清

大阪府大阪市淀川区三津屋中2丁目5番4号 新コスモス電機株式会社内

(72) 発明者 中村 俊一

大阪府大阪市淀川区三津屋中2丁目5番4号 新コスモス電機株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB02 CC03 CC08 FA12
4B050 CC07 DD02 GG10 LL03